

特開平5-203644

(43) 公開日 平成5年(1993)8月10日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53	V	8310-2 J		
A 6 1 B 10/00	N			
	T			
// G 0 1 N 33/577	B	9015-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平4-13195

(22) 出願日 平成4年(1992)1月28日

(71) 出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72) 発明者 小林 浩

静岡県浜松市半田町3776 医大宿舍F-328

(74) 代理人 弁理士 掛樋 悠路 (外4名)

(54) 【発明の名称】 胎便成分の測定方法

(57) 【要約】

【構成】本発明は、検体中のシアリルTN抗原を該抗原に対する抗体を用いて免疫検定して該検体中に存在する胎便成分を測定する方法、殊に検体が羊水、血液及び肺組織から選択されるものである上記方法を提供する。

【効果】本発明方法は、検体中の胎便成分の測定に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】検体中のシアルリンT N抗原を該抗原に対する抗体を用いて免疫検定して該検体中に存在する胎便成分を測定する方法。

【請求項2】検体が羊水である請求項1に記載の方法。

【請求項3】検体が血液である請求項1に記載の方法。

【請求項4】検体が肺組織である請求項1に記載の方法。

【請求項5】検体がラジオイムノアッセイにより行なわれる請求項1に記載の方法。

【請求項6】検体がラテックス凝集反応により行なわれる請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新しい胎便成分の測定方法、より詳しくは羊水混濁の測定及び判定、母体血中に流入した胎便成分の測定、羊水塞栓症の確定診断に有効な、新しい胎便成分の測定方法に関する。

【0002】

【従来技術とその課題】羊水混濁 (meconium staining) とは、羊水が胎便によって着色される現象であり、分娩中に上記羊水混濁を認めた症例での胎児死や胎児死亡の頻度は高く、これが胎児死の重要な徴候の一つとなっている。しかし、上記羊水混濁の判定は、従来破水前では羊水鏡を用いた肉眼判定により、また破水後では漏出する羊水を直接観察することにより行なわれている [秋田幸雄、今中基晴、羊水混濁・産婦の実際、37, 1738-1741, 1988] が、このような目視観察では軽度の羊水混濁は判定困難であり、より高精度で羊水中の胎便成分を測定できる手段の開発が当業界で切望されている。

【0003】また従来より、羊水中の胎便成分が母体血中に流入することにより、母体の肺動脈系が閉塞したり、凝固系を活性化して、致死的な羊水塞栓症、播種性血管内凝固症候群 (DIC) となり、母体死亡に至らせる頻度が高い (母体死亡率80%) ことも知られている [高橋昌俊、羊水塞栓症、日産婦人科連合会報告、54, 68-69, 1991]。かかる母体死危険因子のスクリーニング及び高リスク妊娠の母体把握管理等に有効であると考えられる上記母体血中の胎便成分の確認及び測定法としては、最近、光学的手法を用いた光ファイバーセンサーによる羊水混濁装置が開発されたが、これは現在、大学病院レベルでの臨床応用に止まるに過ぎない [住本和博、金山尚裕、寺尾俊彦、産婦の実際、56, 345, 1988; 住本和博、金山尚裕、寺尾俊彦、川島吉良、山下豊、羊水混濁測定装置の開発、産婦治療、56, 345, 1988; 寺尾俊彦、住本和博、成瀬寛夫、羊水鏡・産婦の実際、38, 347-352, 1989; Kentaro Horiuchi, Kyoko Adachi, Yu

taka Fujise, Hiroo Naruse, Kazuhiro Sumimoto, Naohiro Kanayama and Toshihiko Terao, Isolation and characterization of Zinc coporphyrin I, a major fluorescent component in meconium, Clin. Chem., 37, 1173-1177, 1991]。また、母体血中の亜鉛コプロポルフィリンを高濃度液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定する方法が最近報告された [成瀬寛夫、住本和博、金山尚裕、寺尾俊彦、蛍光を用いた胎便吸引症候群 (MAS) の特異的診断法に関する研究、日産誌、42, 719-726, 1990; Naruse, H., Kanayama, N., Sumimoto, K., Terao, T., and Kawashima, Y., Diagnosis of Meconium Aspiration Syndrome (MAS) and Amniotic Fluid Embolism by the Fluorescent Measurement Based on the Characteristics of Porphyrins, J. Perinat. Med., 17 (Suppl.1), 104, 1989]。しかしながら、上記亜鉛コプロポルフィリンのHPLCによる測定はそれ自体複雑である欠点がある更に、上記羊水塞栓症の確定診断は、一般には死後の肺剖検によることがほとんどであり、肺血管腔内に存在する胎便成分やムチンを染色し、母体肺中に存在する胎便成分の証明によってなされている。剖検による確定診断には組織染色としてヘマトキシリン・エオジン染色、ムチン染色、コトイデオニン染色等が行なわれている [William, D. Roche and Henry, J. Norris, Detection and Significance of Maternal Pulmonary Amniotic Fluid Embolism, Obstet. Gynecol., 43, 1974]。

【0004】本発明は、上記羊水混濁の測定乃至判定、母体血中に流入した胎便成分の測定及び羊水塞栓症の確定診断に有効な新しい胎便成分の測定技術を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記現状より胎便中のムチンに着目し、ムチン母核構造を認識するモノクローナル抗体 (シアルリンT N (STN) 抗原、即ち NeuAcα2→6GalNAcα1→O-Ser/Thr 構造に対する抗体) による羊水塞栓症の非観血的診断技術につき鋭意研究の結果、上記胎便成分の測定が、検体中のSTN抗原の免疫測定によってなし得ること、即ち、検体中のSTN抗原量の測定値が該検体中に存在する胎便成分量と非常によく相関することを見出し、ここに本発明を完成するに至った。

【0006】即ち、本発明は検体中のSTN抗原を該抗原に対する抗体を用いて免疫検定して該検体中に存在する胎便成分を測定する方法、殊に検体が羊水、血液及び肺組織から選ばれるものである上記測定方法に係わる。

【0007】本発明方法は、通常の一般的免疫検定法に従いSTN抗原を測定することによって、検体中の胎便成分の測定を可能とするものであり、従来例のない新しいものである。しかし、従来よりSTN抗原はヒト癌関連抗原として知られておりその測定技術は癌の診断に

研究開発されてきているが、これが胎便成分となんらかの関連を有することは報告された例がなく、本発明者らが独自に見出した新しい知見である。

【0008】本発明方法においては、検体として羊水、血液又は肺組織を用い、これにS/TN抗原に対する抗体を免疫反応させて該検体中のS/TN抗原量を測定する。ここで用いられる検体は特になんらの処理も成されていない臨床サンプルのものでよく、血液の場合は、採血された血液自体及び採血後常法に従い分離された血清、血漿のいずれであってもよい。

【0009】また上記サンプルと免疫反応させるS/TN抗原に対する抗体としては、通常S/TN抗原と特異反応性を有するモノクローナル抗体が好ましく、該抗体は既に種々確立されている。その具体例としては、例えば「TKH-2」、「BM-3」、「BM-4」、「MA 54」、「MA 61」、「B 7.2」、「CC 4.9」

[Cancer Research, 48, 2214-2220 (1988)、特開平2-503387号公報等参照]等を例示でき、之等の内では特にTKH-2がその感度、特異性等の面で好適である。之等のモノクローナル抗体は、免疫抗原として動物から単離されたムチン、例えばヒツジ顎下腺ムチン(OMS)、ウシ顎下腺ムチン(BSM)等のS/TN、即ちムチン型糖蛋白質であって且つポリペプチド鎖を構成するセリン残基(Ser)又はスレオニン残基(Thr)のヒドロキシ基に、N-アセチルガラクトサミン-N-アセチルノイラミン酸残基(NeuAcα2→6GalNAc)が結合したものや、既に確立された細胞ライン、例えば扁平上皮癌細胞ライン(QG56及びLU-65)等の培養上清から単離されたS/TN抗原を用いて、一般的方法に従い製造することができる。即ち、上記免疫抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞(免疫細胞)と哺乳動物のミエロマ細胞との融合細胞(ハイブリドマ、hybridoma)を作成し、これより所望抗体(モノクローナル抗体)を産生するクローンを選択し、該クローンの培養により製造、採取する方法によることができる。上記各方法における、操作等はいずれも公知である[Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 15, 105 (1975); Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 10, 201 (1976); Kosciela, J., Eur. J. Biochem., 37, 214 (1978)等参照]。

【0010】所望の抗体は粗製抗体液、即ち抗体産生ハイブリドマ培養上清或はマウス腹水そのままで使用でき、また硫酸アンモニウム分画やイオン交換クロマトグラフィー或はプロテインA抗原カラム等によるアフィニティクロマトグラフィーにより精製して使用することもできる。尚、上記免疫細胞とミエロマ細胞との融合反応は、公知の方法、例えばマイルス・ステイン(Milstein)らの方法[Method in Enzymology, Vol. 73, 3 (1981)]等に準じて実施でき、得られる所望のハイブリドマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT培地で培養す

ることにより行なわれ、得られるハイブリドマは、通常の限界希釈法により目的とする抗体の検索及び単クローン化に供され、目的抗体産生体の検索は、例えばLISA法[Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980)]、ブラーク法、スポット法、凝集反応法、オクタブローニ(Ouchterlony)法、ラジオイムノアッセイ(RIA)法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法[「ハイブリドマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30-53頁、昭和57年3月5日]に従い実施できる。上記ハイブリドマからの目的モノクローナル抗体の採取は、該ハイブリドマを常法に従って、無血清培地に培養してその培養上清として得る方法やハイブリドマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。上記のごとくして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により精製することができる。

【0011】上記S/TNモノクローナル抗体を用いた免疫反応(S/TN抗原の測定法)は、通常の競合法、サンドイッチ法によるラジオイムノアッセイ(RIA)法、酵素免疫測定法(ELISA)、凝集法、組織染色法等の免疫学的手法に従い実施でき、之等方法の操作、手順等は、常法と変わるところはない。かかる操作において、モノクローナル抗体を不溶化させる場合、該不溶化は常法に従い抗体を不溶性担体に物理的又は化学的に結合させることにより実施でき、不溶化のための不溶性担体としては、例えばポリスチレン、セファデックス、イオン交換樹脂、プラスチックチューブ、アミノ共重合体等を使用でき、不溶化は共有結合法としてのジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による担体結合法、Ug1反応による担体結合法等の化学反応、或はイオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法、ガラスビーズ等の多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法等によって行ない得る。また標識抗体を利用する場合、該標識抗体としては、上記モノクローナル抗体もしくは第2抗体としての既に市販のマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、馬、牛等の動物に免疫して得られる抗イムノグロブリン抗体を、例えばパーオキシダーゼ(POD)、アルカリホスファターゼ等の酵素で標識したものを使用できる。

【0012】上記各種のS/TN抗原の測定系に利用される溶媒としては、反応に悪影響を与えない通常のものをいずれも利用でき、例えばクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液、酢酸緩衝液等のpHが約5~9程度の緩衝液の利用が好ましい。また、測定の際の免疫反応条件は、特に制限はなく、通常のこの種測定法と同様のものとして行うことができる。一般には約45℃以下、好ましくは約4~40℃程度の温度条件下に、約1~8

0時間程度を要して反応を行えばよい。

【0013】上記免疫反応終了後において、反応複合体と非結合標識抗体との分離を要する場合は、例えば遠心分離、濾別、デカンテーション、洗浄等の通常の方法によりこれを行なうことができる。かくして分離された各物質の標識活性の測定は、使用した標識の種類に応じて、公知の各種方法に従い実施することができる。例えば酵素としてパーオキシダーゼを用いる場合には、オ-フェニレンジアミン(OPD)等の発色試薬溶液を用いることができ、発色反応の停止も常法に従い例えば反応液に1~4Nの硫酸等の適当な酵素活性障害剤を添加することにより実施できる。

【0014】かくして、本発明方法によれば、臨床サンプル等の胎便成分を含有する試料を検体として、該検体の胎便成分量を高精度、高感度で、しかも簡便な操作で測定することができる。

【0015】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため、本発明方法につき参考例及び実施例を挙げて詳述する。

【0016】

【参考例1】

① 標準抗原の調製

ヒルらの方法 [Hoyle D. Hill Jr., et al., The Journal of Biological Chemistry, Vol. 252, No. 11, pp. 3791-3798 (1977)] に従って調製したヒツジ頸下腺ムチン(OSM)をSTN抗原として用いて試験を行なった。

【0017】尚、以下の例においては、特開昭64-35271号公報に準じて調製した胎便抽出液を用い、これを400U/mlのSTN抗原濃度と任意に設定して、12.5U/mlまでの段階希釈系列を製作して、標準抗原とした。

【0018】② 不溶性抗原の調製

ポリスチレンビーズ(セキスイ化学工業社製、直径6.3mm)1万個を、30%エタノールを含む1/1000N NaOH水溶液でよく洗浄し、更に蒸留水で十分に洗浄した。

【0019】上記①で調製した胎便抽出液を0.1M炭酸水素ナトリウム緩衝液に溶解し、上記ビーズの1万個を加え、2時間攪拌し、次いで4℃で一晩放置した。

【0020】常法に従い、非特異反応部位のブロック処理後、ビーズを濾取し、充分に洗浄して不溶性抗原を得た。

【0021】③ 標識抗体の調製

モノクローナル抗体TKH-2の200μgを、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)の0.5mlに溶かした溶液を調製し、これにNa¹²⁵I(NEN社製)の1mCiを加えた。

【0022】ヨードゲン(Iodogen, Pierce社製)1mg/mlのジクロロメタン溶液2μgをガラス試験管に

入れ、窒素ガス気流下に溶液をとばして乾燥し、この試験管に上記で調製した抗体溶液を加え、氷冷下10分間かくく攪拌しながら反応させた。この反応物を別の試験管に移し、反応を停止させた後、ゲル濾過[セファロースCL6B(ファルマシア社)使用、溶出液=0.5%BSA及び0.05%NaNO₂を含む50mMクエン酸ナトリウム緩衝液]により、放射活性のピークに一致する1μg画分を採取して、¹²⁵I-標識抗体を得た。

【0023】④ 標準曲線の作成

上記で得たSTN標準抗原、不溶性抗原及び標識抗体を用いて、“STN「オーツカ」RIAキット”(大塚製薬社製)の用法・用量に従った測定操作を実施した。

【0024】得られた結果を、横軸に各STN標準抗原の濃度を対数目盛りで、縦軸に各STN標準抗原のB/B₀(%)をロジット変換して、プロットし、一次回帰より標準曲線を作成した。

【0025】

【実施例1】妊婦検体のSTN量の測定

妊婦より調製した羊水及び血清を検体として利用し、上記の方法をそれぞれ実施(標準抗原の代わりに之等検体を用いる)して、之等各検体中のSTN抗原量を測定した。

【0026】得られた各結果(B/B₀%)を、上記で得た標準曲線のそれぞれにあてはめて各検体中の抗原量(STN抗原量、U/ml)を算出した。

【0027】尚、最初の検査で検体のSTN抗原濃度が400U/mlより高値を示した場合は、その希釈液を調製して、その抗原濃度を測定、算出した。得られた結果を次に示す。

【0028】① 羊水中STN抗原濃度

羊水中のSTN抗原濃度を測定した結果は図1に示す通りである。

【0029】図1は、肉眼的に混濁のない症例(羊水混濁例、Clear AF, n=177)及び肉眼的に混濁の認められた症例(羊水非混濁例、Meconium stained AF, n=30)のそれぞれについてのSTN抗原濃度(U/ml)1)測定結果をプロット(黒丸印)したグラフであり、黒三角印は混濁(intermixture of meconium)を、また白三角印は妊娠17~20週に採取された検体を示す。

【0030】該図より以下のことが判明した。

【0031】即ち、肉眼的に混濁のない症例のSTN抗原濃度の平均±SDは105.3±120.2U/mlであり、肉眼的に混濁の認められた症例のそれは68.4±313.7U/mlであった。後者は、前者に比較して有意に高値を示した(p=0.0263545)。尚、肉眼的に混濁のない症例においても、STN抗原濃度が比較的高値を示す症例も存在した。また、妊娠17~20週に採取された羊水中のSTN抗原濃度は、それ以外の時期に採取されたものよりも高値を示した。一方、羊水混濁例の内、胎便混入のみの症例は、比

較的低値を示した。更に、羊水中STN抗原濃度が400 U/ml以上の症例の殆ど(96%)は、肉眼的に混濁症例であった。

【0032】以上のことより、羊水STN抗原濃度を測定することによって、羊水混濁の程度を定量的に把握することが可能であると推定される。また、羊水混濁のない症例でSTN抗原濃度が高値を示した症例は、肉眼的に検出されない程度の微量の胎便が混入しているものと解釈される。

【0033】② 妊娠中における羊水STN抗原濃度の変化
妊娠中における羊水STN抗原濃度の変化は図2に示す通りである。

【0034】図において、縦軸はSTN抗原濃度(U/ml)を、横軸は妊娠経過期間(Gestational Weeks、週)を示し、白丸印は羊水混濁症例であり、黒丸印は羊水非混濁症例である。

【0035】該図より、妊娠14週以前では羊水中STN抗原濃度は比較的低値を示したが、15週から22週にかけて高値をとり、以後漸減し、再度妊娠35週より漸増する傾向を示し、分娩時期に最高値を示した。

【0036】分娩時に肉眼的に混濁のあった症例のSTN抗原濃度はその殆どが400 U/ml以上を示したが、肉眼的に混濁のなかった症例でも400 U/ml以上を示した症例も存在した。但し、今回の症例中には羊水混濁のためにMASを含め胎児、新生児に重度仮死をきたした症例は含まれておらず、その殆どが正常の妊娠経過をたどった。妊娠15週から22週にかけて高値をとる理由は、妊娠20週頃に胎児の肛門括約筋が発達し閉じると考えられるため、これ以前の羊水には胎便が生理的にも容易に混入しやすいために羊水中STN抗原濃度が高値を示したものと考えられる。

【0037】③ 妊娠中における血清STN抗原濃度の変化
このSTN抗原濃度の変化は図3に示す通りである。

【0038】図3は図2と同様に作成されたグラフであるが、横軸の妊娠期間(40週)以降の数値は分娩後日数を示す。

【0039】該図より、血清STN抗原濃度は羊水中STN抗原濃度とは異なせず、妊娠経過中1例を除いて、いずれの症例も全て50 U/ml以下を推移した。上記高値を示した1例は、羊水混濁、前期破水(PROM)例であった。

【0040】以上より、本発明に従う羊水中STN抗原濃度の測定によれば、羊水混濁の程度、即ち羊水に混入した胎便量を定量的に評価できることが明らかとなった。

【0041】④ 羊水塞栓症の診断における血清STN抗原濃度測定の有用性
羊水塞栓症は羊水中の胎便成分が何らかの原因で母体中

に流入し、血管腔内に栓塞して、血流遮断ないし乏血のためにその血管支配臓器の機能障害をもたらす疾患で、主として肺動脈に栓塞して急激な重症ショック症状、出血を起こす疾患であり、母体致死率は80%程度と非常に高い。その確定診断は現在剖検がもっぱら用いられており、非剖検による診断方法の確立が望まれている。

【0042】本発明によれば、上述した通りSTN抗原濃度により羊水混濁の程度、即ち羊水に混入した胎便の量を定量的に評価できることが判明したので、今回、羊水塞栓症により死亡した症例の母体血清STN抗原濃度(U/ml)を測定することにより、上記非剖検による診断が可能か否かを検討した。

【0043】結果は、図4に示す通りである。

【0044】図は通常分娩例(羊水混濁例(n=15))及び羊水非混濁例(n=17)並びに羊水塞栓症例(AFE、n=4)の各例における血清STN濃度(U/ml)を求めたグラフ(黒丸印)であり、白丸印はPROMを示す。

【0045】該図より、清澄羊水をもつ母体血清中のSTN抗原濃度及び羊水混濁例でもPROMのない症例での該抗原濃度は、全て30 U/ml以下であることが判った。一方、羊水塞栓症では105.6 ± 5.9、0 U/mlという高値が得られた(p < 0.01)。

【0046】このことから、本発明方法によれば、羊水塞栓症の母体血中において高濃度のSTN抗原を検出でき、これにより羊水塞栓症の診断を行ない得ることが明らかとなった。上記羊水塞栓症における母体血中の高濃度STN抗原の証明は、胎便成分が何らかの原因で母体血中に流入し、結果として羊水塞栓症を発生したことの証明である。

【0047】⑤ Zn-α2-マクログロブリン(Zn-α2-M)とSTNとの相関

Zn-α2-Mは、405 nmの励起光に対して580 nmと630 nmに蛍光ピークを有する物質であり、胎便中に特異的存在することが判明している。従って、羊水及び母体血清中の該Zn-α2-M濃度をHPLCにて測定することによって、胎便の混入を定量的に測定することができるといわれている。

【0048】本試験では、本発明方法に従う結果と、上記HPLC測定結果との相関関係を、同一検体について比較検討した。

【0049】その結果、羊水を検体とした場合、両者を同時測定し得た検体22例につき、Zn-α2-Mが20ピコモル/ml以上の検体は3例存在し、之等の検体のSTN値は380 U/ml以上の高値であった。また、Zn-α2-Mが20ピコモル/ml以下の検体(19例)では、STN値は低値から高値まで分散しており、両者は必ずしも相関しないことが判った(r=0.364589)。

【0050】また、母体血清を検体とした場合は、検体

9

29例について、Zn-CPが100ピコモル/ml以上の検体が4例存在し、之等検体のSTN値は、それぞれ5、3、8、3、28/4及び187、3U/mlを示した。上記187、3U/mlを示した症例は羊水塞栓症と診断された。Zn-CPが低値を示した症例では全て母体血清STN値は低値を示した。

【0051】以上のことから、Zn-CPとSTNとはいずれも胎便中に存在するが、その代謝、半減期等は異なる可能性があり、それら相互の相関性は認められなかった($r=0.376736$)。

【0052】

【実施例2】STN抗原を認識する各種抗体と胎便との反応性

STNを認識すると推定されている5種の抗体(TKH-2、MA54、MA61、B72、3及びCC49)について、之等各抗体と胎便との反応性をELISA法にて検討した。即ち、胎便抽出液を96穴のマルチタイタープレートにコーティングし、之等各抗体を各種濃度で反応させた。

【0053】その結果を図5〔縦軸:450nmでの吸光度(A450)、横軸:抗体濃度($\mu\text{g/ml}$)〕に示す。

【0054】図中、黒丸印はTKH-2を、黒三角印はCC49を、黒四角印はMA61を、白丸印はMA54を、白三角印はB72、3をそれぞれ示す。

【0055】該図より、抗体TKH-2が最も低濃度で反応が認められ、次いで抗体CC49、MA61、MA54の順に反応が認められた。一方、抗体B72、3の胎便に対する反応は非常に弱かった。

【0056】次に、胎便抽出液をノイラミダーゼで処理してから各種抗体の反応を検討した。その結果は上記図5と同様に図6に示す通りであり、TKH-2、MA54、MA61の反応は消失していた。

【0057】また、OMSに対する阻害実験を行った。その結果を、用いた抗体毎に、それぞれ図7(TKH-2)、図8(MA54)、図9(MA61)、図10(B72、3)及び図11(CC49)に示す。

【0058】各図において、縦軸は%結合抗体を、横軸は阻害剤濃度(mM)を示す。また各図における阻害剤としては、○がGluを、●がGalを、△がFucを、▲がGluNAcを、□がGalNAcを、■がManを、▽がGal-Gluを、▼がNeuAcを、×がNeuAc-Galβ-Gluを、※がMalを、◎がOSMを、それぞれ示す。

【0059】上記の結果、抗体CC49は比較的阻害がからなかった。それ以外の抗体は全てOMSにより完全に阻害された。

【0060】以上の実験より、胎便との反応性は抗体TKH-2が最もよく、この抗体はSTN抗原を認識していることが確認され、感度及び特異性の面で、本発明に

10

より有効に利用できることが判った。

【0061】

【実施例3】日本白色種家兎を使用し実験的羊水塞栓症を作成した。1%の胎便溶液を作成し、下大静脈より10秒以内に5mlを注入した。この条件では家兎は死に至らなかった。胎便溶液を注入してから1時間後に肺を摘出し、ホルマリン固定後、組織染色を行なった。この時の血清STN値は150~200U/mlであった。組織染色としてHE染色とTKH-2による免疫染色を行なった。之等と比較した。

【0062】その結果、HE染色では何等の特徴的な所見は得られなかったが、TKH-2染色では肺動脈血管内にびまん性にTKH-2が染色された。一方、TKH-2は肺の気管支脈の一部にも陽性像を認めるが、羊水塞栓症という疾患の特性上、肺動脈内に胎便成分が認識できれば診断が確定するため、気管支脈の陽性所見は診断確定に何等の影響をも及ぼさない。

【0063】

【実施例4】羊水塞栓症診断のための簡易測定試薬の開発

本発明によれば、現在血清中のSTN濃度はRIAにより測定しているが、疾患の緊急性を考えると、この方法では尚不十分な点があり、ラテックス凝集法等による簡易測定試薬の開発が望まれ、かかる要求に合致する簡易測定試薬が提供できる。診断としては半定量法で充分であり、血清中のSTN濃度が50U/ml未満であり、50~100U/mlを+、100~150U/mlを++、150U/mlを+++として、反応するような免疫学的判定を行なえばよい。即ち、本発明によれば、血清中STN濃度が50U/ml未満を「羊水塞栓症の疑いなし」、50~100U/mlを「羊水塞栓症の疑いあり」、100~150U/mlを「羊水塞栓症と診断し得る」、150U/mlを「羊水塞栓症を強く診断する」に分けて判定するような簡易測定試薬を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例に従う羊水中STN抗原濃度の測定結果を示すグラフである。

【図2】実施例に従う羊水中STN抗原濃度の測定結果を示すグラフである。

【図3】実施例に従う血清中STN抗原濃度の測定結果を示すグラフである。

【図4】実施例に従う血清中STN抗原濃度の測定結果を示すグラフである。

【図5】実施例に従う胎便抽出液に対する各種抗体(TKH-2、MA54、MA61、B72、3、CC49)の反応性を調べたグラフである。

【図6】実施例に従うノイラミダーゼ処理後の胎便抽出液に対する各種抗体の反応性を調べたグラフである。

【図7】実施例に従う胎便抽出液に対するTKH-2抗

11

体の反応性阻害を調べたグラフである。

【図8】実施例に従う胎便抽出液に対するMA54抗体の反応性阻害を調べたグラフである。

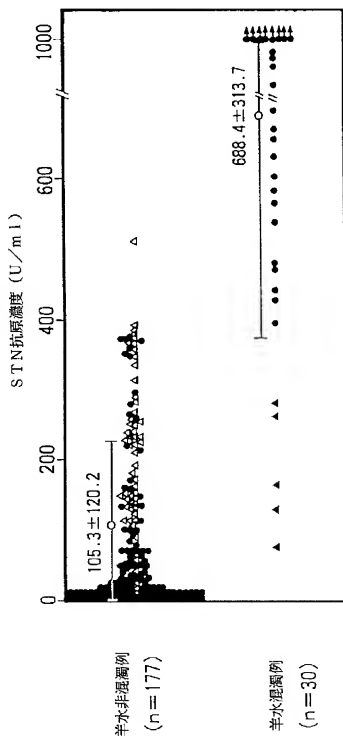
【図9】実施例に従う胎便抽出液に対するMA61抗体の反応性阻害を調べたグラフである。

12

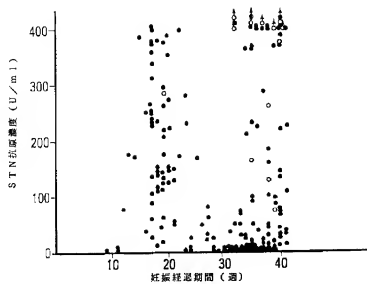
【図10】実施例に従う胎便抽出液に対するB72.3抗体の反応性阻害を調べたグラフである。

【図11】実施例に従う胎便抽出液に対するCC49抗体の反応性阻害を調べたグラフである。

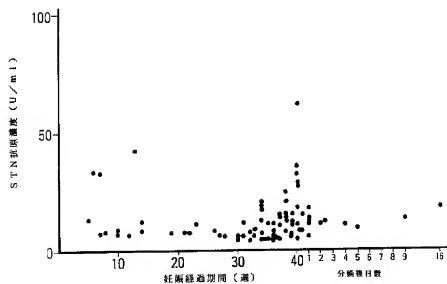
【図1】



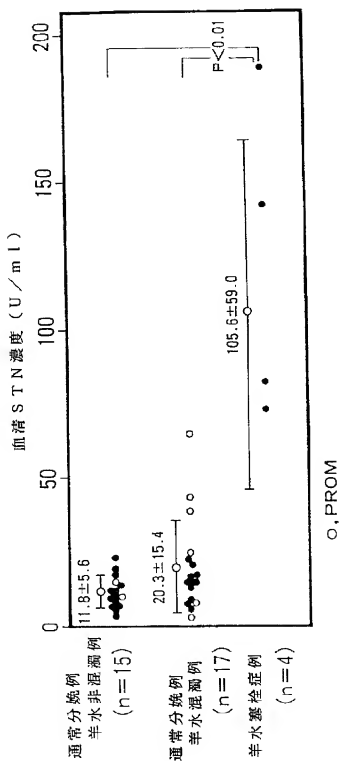
【図2】



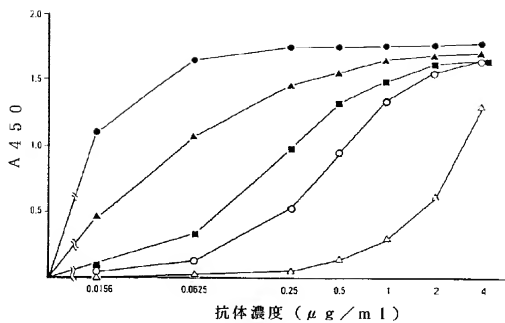
【図3】



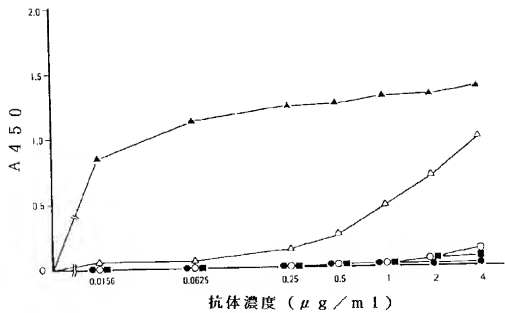
【図4】



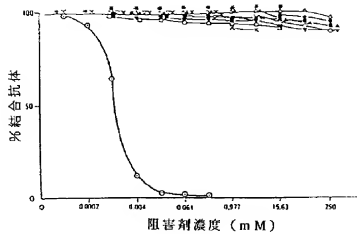
【図5】



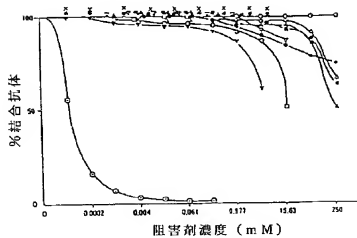
【図6】



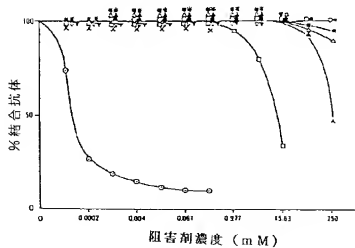
【図7】



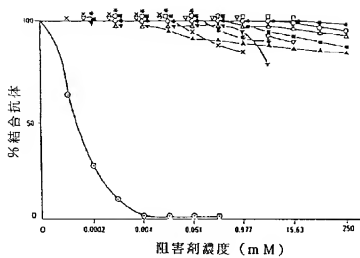
【図8】



【図10】



【圖9】



【圖11】

